

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 83810060.0

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>: A 61 K 9/50

(22) Anmeldetag: 11.02.83

(30) Priorität: 17.02.82 CH 981/82  
17.01.83 CH 237/83

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
07.09.83 Patentblatt 83/36

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: CIBA-GEIGY AG  
Patentabteilung Postfach  
CH-4002 Basel(CH)

(72) Erfinder: Hauser, Helmut, Dr.  
Schwarzbachstrasse 91  
CH-8713 Uerikon(CH)

(54) Lipide in wässriger Phase.

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues, vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von unilamellaren Liposomen in wässriger Phase durch Ueberführen einer geeigneten Lipidkomponente, z.B. Phosphatidsäure, in die ionische Form, indem man die Lipiddispersion einer pH-Aenderung unterwirft und anschliessend neutralisiert. Die Bildung der unilamellaren Liposome erfolgt spontan d.h. ohne zusätzliche äussere Energiezufuhr. Die verfahrensgemäss erhältlichen Liposome können als Träger von Wirkstoffen unterschiedlichster Art therapeutisch verwendet werden.

CIBA-GEIGY AG  
Basel (Schweiz)

4-13808/1+2

### Lipide in wässriger Phase

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von unilamellaren Liposomen in wässriger Phase.

Liposomen sind in der Literatur in zahlreichen Veröffentlichungen beschrieben worden. Ihr Aufbau und ihre Verwendung ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Man unterscheidet unilamellare Liposomen mit einer Doppelschicht aus Lipiden von multilamellaren Liposomen mit mehreren Doppelschichten aus Lipiden, die zwiebförmig angeordnet sind.

Unilamellare Liposomen haben eine kugelförmige Hülle und beispielsweise einen Durchmesser von ca. 200 bis 50000 Å, vorzugsweise ca. 200 bis 30000 Å. Die kugelförmige Hülle besteht aus einer Doppelschicht der Lipidkomponenten, z.B. amphipatischen Lipiden, z.B. Phospholipiden, z.B. Phosphatidsäure, Lecithin oder Kephalin, und gegebenenfalls neutralen Lipiden, z.B. Cholesterin. Diese Doppelschicht umschliesst einen Innenraum, der eine wässrige Phase enthält. Unilamellare Liposomen werden auch als "Vesikel" bezeichnet.

Es besteht grosses Interesse an der therapeutischen Verwendung von Liposomen als Träger von Wirkstoffen unterschiedlichster Art. So sind Liposomen als Träger von Proteinen, z.B. Antikörpern oder Enzymen, Hormonen, Vitaminen oder Genen oder zu analytischen Zwecken als Träger von markierten Verbindungen vorgeschlagen worden. Als Beispiel sei die US-Patentschrift 3,993,754 genannt, welche ein chemotherapeutisches Verfahren bei der Behandlung von Tumorzellen unter Verwendung von Liposomen als Träger zum Gegenstand hat.

Der betreffende Wirkstoff wird entweder bei der Bildung der Liposomen oder nachträglich durch Diffusion verkapselt. Die Herstellung von Liposomen und die Verkapselung des Wirkstoffs kann auf verschiedene Weise erfolgen und ist in dem Uebersichtsartikel "Liposomes-Problems and promise as selective drug carriers" von Kaye, St. B., Cancer Treatment Reviews (1981) 8, 27-50, beschrieben. Weitere Verfahren zur Herstellung von Liposomen zwecks Verkapselung von Wirkstoffen sind ebenfalls durch Barenholz et al. in Biochemistry, Vol 16, No. 12, 2806-2810, sowie in den Deutschen Offenlegungsschriften (DOS) 28 19 855, 29 02 672, 25 32 317 und 28 42 608, in der US-Patentschrift 4,053,585 und in der Europäischen Patentanmeldung 36 676 beschrieben.

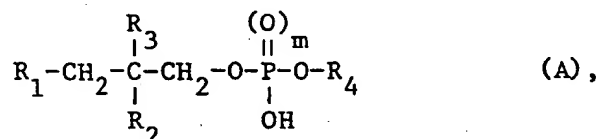
Man löst beispielsweise die Lipidkomponenten, z.B. Phospholipide, z.B. Phosphatidsäure, Lecithin oder Kephalin, und gegebenenfalls neutrale Lipide, z.B. Cholesterin, in einem organischen Lösungsmittel, z.B. Chloroform oder Benzol, auf. Nach dem Eindampfen bleibt eine homogene Schicht, z.B. eine Filmschicht, der betreffenden Lipidkomponenten zurück. Man dispergiert anschliessend die Lipidkomponenten in einer wässrigen Phase, welche den betreffenden Wirkstoff enthält, z.B. durch Schütteln. Bei der anschliessenden Behandlung mit Ultraschall bilden sich unilamellare Liposomen, welche den Wirkstoff verkapseln.

Nach vielen bisher bekannt gewordenen Verfahren erhält man wässrige Phasen sowohl mit Mischungen von unilamellaren als auch multilamellaren Liposomen, wobei Struktur und Grösse dieser Liposomen zufällig und kaum beeinflussbar sind und beträchtlich variieren können. Wässrige Phase mit überwiegendem Anteil an unilamellaren Liposomen erhält man bisher nur mit apparativ aufwendigen Herstellungsverfahren, z.B. durch Ultraschallbehandlung, Dialysieren oder Gelfiltration.

Nach dem Verfahren der vorliegenden Erfindung lassen sich auf einfache Weise wässrige Phasen mit einem hohen bis fast quantitativen Anteil an unilamellaren Liposomen herstellen, welche kleine unilamellare Liposomen (KUL) mit einem Durchmesser von ca. 200 - 600 Å und grosse unilamellare Liposomen (GUL) mit einem Durchmesser von ca. 600 - 3000 Å enthalten können. Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass man KUL und GUL von relativ einheitlicher Grösse erhält und dass man das Mengenverhältnis von KUL zu GUL in der dispersen Phase variieren kann. Mittels geeigneter Trennmethode, z.B. Gelfiltration oder einer Ultrafiltrationszelle, kann man kleine von grossen unilamellaren Liposomen abtrennen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von unilamellaren Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) ein Lipid der Formel



worin m null oder ein ist, einer der Reste  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Wasserstoff, Hydroxy, Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und der andere Rest Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $\text{R}_3$  Wasserstoff oder Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und  $\text{R}_4$  Wasserstoff, Niederalkyl mit 1-7 C-Atomen, einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen oder, wenn  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Wasserstoff oder Hydroxy und  $\text{R}_3$  Wasserstoff bedeuten, einen Steroidrest bedeuten, und ein geeignetes zusätzliches Lipid und/oder eine Fettsäure und ein geeignetes zusätzliches Lipid mit Ausnahme eines Sterins oder

ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist,  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $\text{R}_3$  und  $\text{R}_4$  Wasserstoff bedeuten und gegebenenfalls ein geeignetes zusätzliches Lipid

in wässriger Phase mit einem pH-Wert grösser als 7 dispergiert, oder

b) ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist, einer der Reste  $R_1$  und  $R_2$  Wasserstoff, Hydroxy, Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und der andere Rest Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  durch eine Ammoniumgruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, und gegebenenfalls ein geeignetes zusätzliches Lipid oder

ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist,  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  durch eine Ammoniumniederalkylammoniumgruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, und ein geeignetes zusätzliches Lipid in wässriger Phase mit einem pH-Wert kleiner als 7 dispergiert, und, wenn notwendig, die wässrige Phase neutralisiert und, wenn erwünscht, die erhältlichen unilamellaren Liposomen anreichert und/oder abtrennt.

Die weiter vorn und im folgenden verwendeten allgemeinen Begriffe haben im Rahmen der vorliegenden Beschreibung vorzugsweise die folgenden Bedeutungen:

#### Verfahren a)

Niederalkyl  $R_1$ ,  $R_2$  oder  $R_3$  mit 1-4 C-Atomen ist z.B. bevorzugt Methyl, ferner Äthyl, n-Propyl, oder n-Butyl.

Alkyl  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise n-Decyl, n-Undecyl, n-Dodecyl (Lauryl), n-Tridecyl, n-Tetradecyl (Myristyl), n-Pentadecyl, n-Hexadecyl (Cetyl), n-Octadecyl (Stearyl) oder n-Eicosyl (Arachinyl), ferner n-Heptadecyl oder n-Nonadecyl.

n-Heptadecyl oder n-Nonadecyl.

Alkenyl  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise 9-cis-Dodecenyl (Lauroleyl), 9-cis-Tetradecenyl (Myristoleyl), 9-cis-Hexadecenyl (Palmitoleinyl), 6-cis-Octadecenyl (Petroselinyl), 6-trans-Octadecenyl (Petroselaidinyl), 9-cis-Octadecenyl (Oleyl), 9-trans-Octadecenyl (Elaidinyl) oder 9-cis-Eicosenyl (Gadoleinyl), ferner 1-Decenyl, 1-Undecenyl, 1-Dodecenyl, 1-Tridecenyl, 1-Tetradecenyl, 1-Pentadecenyl, 1-Hexadecenyl, 1-Heptadecenyl, 1-Octadecenyl, 9-cis-12-trans-Octadecadienyl (Linolyl), 9-trans-12-trans-Octadecadienyl (Linolaidinyl), 9-cis-12-cis-Octadienyl (Linoleyl), 9-cis-11-trans-13-trans-Octadecatrienyl ( $\beta$ -Eläostearinyl), 9-cis-12-cis-15-cis-Octadecatrienyl (Linolenyl), 9-, 11-, 13- 15-Octadecatetraenyl (Parinaryl), 1-Nonadecenyl, 1-Eicosenyl, 5-, 11-, 14-Eicosatrienyl oder 5-, 8-, 11-, 14-Eicosatetraenyl (Arachidonyl).

Alkoxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise n-Decyloxy, n-Dodecyloxy (Lauryloxy), n-Tetradecyloxy (Myristyloxy), n-Hexadecyloxy (Cetyloxy), n-Octadecyloxy (Stearyloxy) oder n-Eicosyloxy (Arachinyloxy), ferner n-Undecyloxy, n-Tridecyloxy, n-Pentadecyloxy, n-Heptadecyloxy oder n-Nonadecyloxy.

Alkenyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise 9-cis-Dodecenyloxy (Lauroleyloxy), 9-cis-Tetradecenyloxy (Myristoleyloxy), 9-cis-Hexadecenyloxy (Palmitoleinyloxy), 6-cis-Octadecenyloxy (Petroselinyloxy), 6-trans-Octadecenyloxy (Petroselaidinyloxy), 9-cis-Octadecenyloxy (Oleyloxy), 9-trans-Octadecenyloxy (Elaidinyloxy) oder 9-cis-Eicosenyl (Gadoleinyloxy), ferner 1-Decenyloxy, 1-Undecenyloxy, 1-Dodecenyloxy, 1-Tridecenyloxy, 1-Tetradecenyloxy, 1-Pentadecenyloxy, 1-Hexadecenyloxy, 1-Heptadecenyloxy, 1-Octadecenyloxy, 9-cis-12-trans-Octadecadienyloxy (Linolyloxy), 9-trans-12-trans-Octadecadienyloxy (Linolaidinyloxy), 9-cis-12-cis-Octadienyloxy (Linoleyloxy), 9-cis-11-trans-13-trans-Octadecatrienyloxy ( $\beta$ -Eläostearinyloxy), 9-cis-12-cis-15-cis-Octadecatrienyloxy (Linolenyloxy), 9-, 11-, 13-, 15-Octadecatetraenyloxy (Parinaryloxy), 1-Nonadecenyloxy, 1-Eicosenyloxy, 5-, 11-, 14-Eicosatrienyloxy oder 5-, 8-, 11-, 14-Eicosatetraenyloxy (Arachidonyloxy).

Acyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  mit je 10-50 C-Atomen ist beispielsweise Alkanoyloxy, durch ein aromatisches Ringsystem substituiertes Alkanoyloxy oder Alkenoyloxy.

Alkanoyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise n-Decanoyloxy, n-Dodecanoyloxy (Lauroyloxy), n-Tetradecanoyloxy (Myristoyloxy), n-Hexadecanoyloxy, n-Hexadecanoyloxy (Palmitoyloxy), n-Octadecanoyloxy (Stearoyloxy) oder n-Eicosoyloxy (Arachinoyloxy), ferner n-Undecanoyloxy, n-Tridecanoyloxy, n-Pentadecanoyloxy, n-Heptadecanoyloxy oder n-Nonadecanoyloxy.

Durch ein aromatisches Ringsystem substituiertes Alkanoyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist beispielsweise Phenyl-n-alkanoyloxy, worin der Phenylrest sich in  $\omega$ -Stellung des Alkanoyloxyrests befindet, z.B. Phenyl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy, -n-hexanoyloxy, -n-heptanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-nonanoyloxy, -n-decanoyloxy, -n-undecanoyloxy oder Phenyl-n-dodecanoyloxy, 3- oder 4-, vorzugsweise 4-Alkylphenyl-n-alkanoyloxy, worin der Alkylphenylrest sich in  $\omega$ -Stellung des Alkanoyloxyrests befindet, z.B. 4-n-Butyl-, 4-n-Pentyl-, 4-n-Hexyl-, 4-n-Octyl-, 4-n-Decyl- oder 4-n-Dodecylphenyl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy-, -n-hexanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-decanoyloxy oder -n-dodecanoyloxy, Pyren-1-yl-n-alkanoyloxy, worin der Pyrenrest sich in  $\omega$ -Stellung des Alkanoyloxyrests befindet, z.B. Pyren-1-yl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy, -n-hexanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-decanoyloxy oder Pyren-1-yl-decanoyloxy, oder 6- oder 8-Alkylpyren-1-yl-n-alkanoyloxy, worin der Alkylpyren-1-ylrest sich in  $\omega$ -Stellung des Alkanoyloxyrests befindet, z.B. 6- oder 8-Niederalkyl-, z.B. 6- oder 8-Aethylpyren-1-yl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy, -n-hexanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-decanoyloxy oder -n-decanoyloxy, oder 6- oder 8-n-Butylpyren-1-yl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy, -n-hexanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-decanoyloxy oder -n-dodecanoyloxy, oder 6- oder 8-Alkylpyren-1-yl-n-alkanoyloxy, z.B. 6- oder 8-n-Decyl-, -n-Dodecyl-, -n-Tetradecyl-, -n-Hexadecyl- oder 6- oder 8-n-Octadecylpyren-1-yl-n-butyryloxy, -n-pentanoyloxy, -n-hexanoyloxy, -n-octanoyloxy, -n-decanoyloxy oder -n-dodecanoyloxy.



Durch ein aromatisches Ringsystem substituiertes Alkanoyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise 4-(4-n-Decylphenyl)-decanoyl, 4-(Pyren-1-yl)-butanoyl, 6-(Pyren-1-yl)-hexanoyl, 8-(Pyren-1-yl)-octanoyl, 10-(Pyren-1-yl)-octanoyl, 6-(6- oder 8-Aethylpyren-1-yl)-octanoyl, 6-(6- oder 8-n-Butylpyren-1-yl)-hexanoyl und 10-(6- oder 8-n-Octadecylpyren-1-yl)-decanoyl.

Alkenoyloxy  $R_1$  oder  $R_2$  ist vorzugsweise 9-cis-Dodecenyloxy (Lauroleoyloxy), 9-cis-Tetradecenoyloxy (Myristoleoyloxy), 9-cis-Hexadecenoyloxy (Palmitoleinoyloxy), 6-cis-Octadecenoyloxy (Petroselinoyloxy), 6-trans-Octadecenoyloxy (Petroselaidinoyloxy), 9-cis-Octadecenoyloxy (Oleoyloxy), 9-trans-Octadecenoyloxy (Elaidinoyloxy) oder 9-cis-Eicosenoyl (Gadoleinoyloxy), ferner 9-cis-12-trans-Octadienoyloxy (Linoloyl), 9-trans-12-trans-Octadecadienoyloxy (Linolaidinoyloxy), 9-cis-12-cis-Octadienoyloxy (Linoleoyloxy), 9-cis-11-trans-13-trans-Octadecatrienoyloxy (Linolenoyloxy), 9-, 11-, 13-, 15-Octadecatetraenoyloxy (Parinaroyloxy), 5-, 11-, 14-Eicosatrienoyloxy oder 5-, 8-, 11-, 14-Eicosatetraenoyloxy (Arachidonoyloxy).

Niederalkyl  $R_4$  mit 1-7 C-Atomen ist z.B. Methyl, Aethyl, Isopropyl, n-Propyl, Isobutyl oder n-Butyl, und kann durch saure Gruppen, z.B. Carboxyl oder Sulfo, basische Gruppen, z.B. Amino, Niederalkylamino, z.B. Methyl- oder Aethylamino, Diniederalkylamino, z.B. Dimethyl- oder Diäthylamino, saure und basische Gruppen, z.B. Carboxy und Amino, wobei die Aminogruppe sich in  $\alpha$ -Stellung zur Carboxylgruppe befindet, eine Triniederalkylammoniumgruppe, z.B. Trimethyl- oder Triäthylammonio, freie oder verätherte Hydroxygruppen, wobei zwei verätherte Hydroxygruppen durch einen bivalenten Kohlenwasserstoffrest, z.B. durch Methylen, Äthylen, Äthyliden, 1,2-Propylen oder 2,2-Propylen, miteinander verbunden sein können, Halogen, z.B. Chlor oder Brom, Niederalkoxycarbonyl, z.B. Methoxy- oder Äthoxycarbonyl, oder durch Niederalkansulfonyl, z.B. Methansulfonyl, substituiert sein.

Substituiertes Niederalkyl  $R_4$  mit 1-7 C-Atomen ist vorzugsweise Carboxyniederalkyl, z.B. Carboxymethyl, 2-Carboxyäthyl oder 3-Carboxy-n-propyl, Aminoniederalkyl, z.B. Aminomethyl, 2-Aminoäthyl oder 3-Amino-n-propyl, Niederalkylaminoniederalkyl, z.B. Methyl- oder Äthylaminomethyl, 2-Methylaminoäthyl oder 3-Methylamino-n-propyl, Diniederalkylaminoniederalkyl, z.B. Dimethyl- oder Diäthylaminomethyl, 2-Dimethylaminoäthyl oder 3-Dimethylamino-n-propyl,  $\omega$ -Amino- $\omega$ -carboxyniederalkyl, z.B. 2-Amino-2-carboxyäthyl oder 3-Amino-3-carboxy-n-propyl, Triniederalkylammonioniederalkyl, z.B. 2-Trimethyl- oder 2-Triäthylammonioäthyl oder 3-Trimethyl- oder 3-Triäthylammonio-n-propyl, Hydroxyniederalkyl, z.B. 2-Hydroxyäthyl oder 2,3-Dihydroxypropyl, Niederalkoxyniederalkyl, z.B. Methoxy- oder Äthoxymethyl, 2-Methoxyäthyl oder 3-Methoxy-n-propyl, Niederalkylendioxy-niederalkyl, z.B. 2,3-Äthylendioxypropyl oder 2,3-(2,2-Propylen)-dioxypropyl, oder Halogenniederalkyl, z.B. Chlor oder Brommethyl, 2-Chlor- oder 2-Bromäthyl, 2- oder 3-Chlor- oder 2- oder 3-Brom-n-propyl.

Ein Kohlenhydratrest  $R_4$  mit 5-12 C-Atomen ist beispielsweise ein natürlicher Monosaccharidrest, der sich von einer als Aldose oder Ketose vorliegenden Pentose oder Hexose ableitet.

Eine als Aldose vorliegende Pentose ist z.B. D-Ribose, D-Arabinose, D-Xylose oder D-Lyxose.

Eine als Ketose vorliegende Pentose ist z.B. D-Ribulose oder D-Xylulose.

Eine als Aldose vorliegende Hexose ist z.B. D-Allose, D-Altrose, D-Glucose, D-Mannose, D-Galactose oder D-Talose.

Eine als Ketose vorliegende Hexose ist z.B. D-Psicose, D-Fructose, D-Sorbose oder D-Tagatose.

Eine Hexose liegt vorzugsweise in zyklischer Form vor, z.B. als Pyranose (Aldose), z.B.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -D-Glucopyranose, oder als Furanose, z.B.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -D-Fructofuranose. Der Pyranosylrest ist vorzugsweise durch die in 1- oder 6-Stellung und der Furanosylrest durch in 1- oder 5-Stellung befindliche Hydroxygruppe mit der Phosphatidylgruppe verestert.

Ein Kohlehydratrest  $R_4$  mit 5-12 C-Atomen ist ferner ein natürlicher Disaccharidrest, z.B. ein aus zwei Hexosen gebildeter Disaccharidrest, der beispielsweise durch Kondensation von zwei Aldosen, z.B. D-Glucose oder D-Galactose oder einer Aldose, z.B. D-Glucose mit einer Ketose, z.B. Fructose, gebildet wird. Aus zwei Aldosen gebildete Disaccharide, z.B. Lactose oder Maltose, sind vorzugsweise über die in 6-Stellung des betreffenden Pyranosylrests befindliche Hydroxygruppe mit der Phosphatidylgruppe verestert. Aus einer Aldose und einer Ketose gebildete Disaccharide, z.B. Saccharose, sind vorzugsweise über die in 6-Stellung des Pyranosylrests oder über die in 1-Stellung des Furanosylrests befindliche Hydroxygruppe mit der Phosphatidylgruppe verestert.

Ein Kohlehydratrest  $R_4$  mit 5-12 C-Atomen ist ferner ein derivatisierter Mono- oder Disaccharidrest, worin beispielsweise die Aldehydgruppe und/oder ein oder zwei endständige Hydroxygruppen zu Carboxylgruppen oxydiert sind, z.B. ein D-Glucon-, D-Glucar- oder D-Glucoronsäurerest, welche vorzugsweise als zyklische Lactonreste vorliegen. Ebenso können in einem derivatisierten Mono- oder Disaccharidrest Aldehyd- oder Ketogruppen zu Hydroxygruppen reduziert sein, z.B. Inosit, Sorbit oder D-Mannit, oder Hydroxygruppen durch Wasserstoff, z.B. Desoxyzucker, z.B. 2-Desoxy-D-ribose, L-Rhamnose oder L-Fucose, oder durch Aminogruppen, z.B. Aminozucker, z.B. D-Glucosamin oder D-Galactosamin, ersetzt sein.

Ein Kohlehydrat  $R_4$  kann ebenfalls ein durch Umsetzung eines der genannten Mono- oder Disaccharide mit einem starken Oxydationsmittel, z.B. Perjodsäure, gebildetes Spaltprodukt sein.

Ein Steroidrest  $R_4$  ist beispielsweise ein Sterinrest, der über die in 3-Stellung des Steroidgerüsts befindliche Hydroxygruppe mit der Phosphatidylgruppe verestert ist.

Ein Sterinrest ist beispielsweise Lanosterin, Sitosterin, Koprostanol, Cholestanol, Glykocholsäure, Ergosterin oder Stigmasterin, vorzugsweise Cholesterin.

Wenn  $R_4$  einen Steroidrest darstellt, sind  $R_1$  und  $R_2$  vorzugsweise Hydroxy und  $R_3$  ist Wasserstoff.

Eine Fettsäure ist beispielsweise eine gesättigte oder ungesättigte aliphatische Carbonsäure mit 4 bis 26, bevorzugt 10 bis 20, Kohlenstoffatomen.

Eine gesättigte aliphatische Carbonsäure ist beispielsweise eine geradkettige aliphatische Carbonsäure mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen, z.B. Caprinsäure (C-10), Undecansäure (C-11), Laurinsäure (C-12), Tridecansäure (C-13), Myristinsäure (C-14), Pentadecansäure (C-15), Palmitinsäure (C-16), Margarinsäure (C-17), Stearinsäure (C-18), Nonadecansäure (C-19) oder Arachinsäure (C-20).

Eine gesättigte aliphatische Carbonsäure ist beispielsweise eine verzweigt-kettige aliphatische Carbonsäure mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen, z.B. Isomyristinsäure (C-14), Isopalmitinsäure (C-16), Isostearinsäure (C-18).

Eine ungesättigte aliphatische Carbonsäure mit 10-20 Kohlenstoffatomen hat beispielsweise eine gerade Anzahl von Kohlenstoffatomen und bis zu fünf Doppelbindungen und ist beispielsweise Myristoleinsäure (C-14), Palmitoleinsäure (C-16), Palmitaleidinsäure (C-16), Petroselininsäure (C-16), Oelsäure (C-18), Elaidinsäure (C-18), Vaccensäure (C-18), Linolsäure (C-18), Linolelaidinsäure (C-18), Linolensäure (C-18), cis-Eicos-5-ensäure (C-20), cis-11-Eicosensäure, 11,14-Eicosadiensäure, 11-, 14-, 17-Eicosatriensäure, Arachidonsäure oder 5-, 8-, 11-, 14-, 17-Eicosapentaensäure.

Die betreffende Fettsäure kann in undissoziierter Form oder in Form eines Salzes, z.B. als Alkalimetall-, z.B. Natrium- oder Kaliumsalz, vorliegen.

Ein geeignetes zusätzliches Lipid ist beispielsweise ein Lipid der Formel A, worin  $m$  null oder eins ist,  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  Wasserstoff oder Niederalkyl mit je 1-7 C-Atomen, einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen oder einen Steroidrest bedeuten.

$R_1$ ,  $R_2$  und  $R_3$  haben die weiter vorn genannten Bedeutungen.  $R_4$  ist ausserdem durch Triniederalkylammonio, z.B. Trimethylammonio, substituiertes Niederalkyl, z.B. 2-Trimethylammonioäthyl (Cholinyl).

Ein geeignetes zusätzliches Lipid ist vorzugsweise ein Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl oder 2-Aminoäthyl darstellen.

Ein solches zusätzliches Lipid ist z.B. ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin oder Lecithin aus Sojabohnen, wenn  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl bedeutet, und ein natürliches Kephalin, z.B. Ei-Kephalin oder Kephalin aus Sojabohnen, wenn  $R_4$  2-Aminoäthyl bedeutet.

Ausserdem sind als zusätzliche Lipide synthetische Lecithine ( $R_4$  = 2-Trimethylammonioäthyl) und synthetische Kephale ( $R_4$  = 2-Aminoäthyl) der Formel A bevorzugt, worin  $R_1$  und  $R_2$  identische Acyloxyreste, z.B. Lauroyloxy, Oleoyloxy, Linoyloxy, Linoleoyloxy oder Arachinoyloxy bedeuten, z.B. Dilauroyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl-, Distearoyl-, Diarachinoyl-, Dioleoyl-, Dilinoyl-, Dilinoleoyl-, oder Diarachinoyllecithin oder -kephalin,  $R_1$  und  $R_2$  verschiedene Acyloxyreste, z.B.  $R_1$  Palmitoyloxy und  $R_2$  Oleoyloxy, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyl-lecithin oder -kephalin,  $R_1$  und  $R_2$  identische Alkoxyreste, z.B. Tetradecyloxy oder Hexadecyloxy, z.B. Ditetradecyl- oder Dihexadecyllecithin oder -kephalin,  $R_1$  Alkenyl und  $R_2$  Acyloxy, z.B. ein Plasmalogen ( $R_4$  = Trimethylammonioäthyl), oder  $R_1$  Acyloxy, z.B. Myristoyloxy oder Palmitoyloxy, und  $R_2$  Hydroxy, z.B. ein natürliches oder synthetisches Lysolecithin oder Lysokephalin, z.B. 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysolecithin oder -kephalin, und  $R_3$  Wasserstoff darstellen.

Ein geeignetes zusätzliches Lipid ist ferner ein Lipid der Formel A, worin m eins ist,  $R_1$  Alkenyl,  $R_2$  Acylamido,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  einen 2-Trimethylammonioäthyl-Rest (Cholinrest) darstellen. Ein solches Lipid ist unter dem Namen Sphingomyelin bekannt.

Ein geeignetes zusätzliches Lipid ist ausserdem ein Lysolecithin-Analogen, z.B. 1-Lauroyl-1,3-propandiol-3-phosphorylcholin, ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, ein Cerebrosid, ein Gangliosid oder ein Glycerid, welches keine freie oder verätherte Phosphoryl- oder Phosphonylgruppe in 3-Stellung enthält. Ein solches Glycerid ist beispielsweise ein Diacylglycerid oder 1-Alkenyl-1-hydroxy-2-acylglycerid mit den genannten Acyl- bzw. Alkenylgruppen, worin die 3-Hydroxygruppe durch einen der genannten Kohlehydratreste, z.B. einen Galactosylrest, veräthert ist, z.B. ein Monogalactosylglycerin.

Ein zusätzliches Lipid ist ferner ein neutrales Lipid, welches in Zellmembranen enthalten und nur in apolaren organischen Lösungsmitteln, z.B. in Chloroform, löslich ist. Neutrale Lipide sind beispielsweise Steroide, z.B. Oestradiol oder Sterine, z.B. Cholesterin,  $\beta$ -Sito-sterin, Desmosterin, 7-Keto-Cholesterin oder  $\beta$ -Cholestanol, fettlösliche Vitamine, z.B. Vitamin A, z.B. Vitamin  $A_1$  oder  $A_2$ , Vitamin E, Vitamin K, z.B. Vitamin  $K_1$  oder  $K_2$ , Vitamin  $D_2$  oder  $D_3$ , oder ein beliebiges Protein.

Bevorzugt enthält die wässrige Dispersion ein Lipid der Formel A, worin m eins ist,  $R_1$  Alkyl, z.B. n-Dodecyl (Lauryl), n-Tridecyl, n-Tetradecyl (Myristyl), n-Pentadecyl, n-Hexadecyl (Cetyl), n-Heptadecyl oder n-Octadecyl (Stearyl), Alkoxy, z.B. n-Dodecyloxy (Lauryloxy), n-Tetradecyloxy (Myristyloxy), n-Hexadecyloxy (Cetyloxy), oder n-Octadecyloxy (Stearyloxy), Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_2$  Wasserstoff oder Hydroxy,  $R_3$  Wasserstoff oder Niederalkyl, z.B. Methyl, und  $R_4$  Wasserstoff, Niederalkyl, z.B. Methyl oder Aethyl, Niederalkyl substituiert durch saure und

basische Gruppen, z.B. Carboxy und Amino, z.B.  $\omega$ -Amino- $\omega$ -carboxy-niederalkyl, z.B. 2-Amino-2-carboxyäthyl oder 3-Amino-3-carboxy-n-propyl, Hydroxyniederalkyl, z.B. 2-Hydroxyäthyl oder 2,3-Hydroxypropyl, Niederalkylendioxy-niederalkyl, z.B. 2,3-Aethylendioxypropyl oder 2,3-(2,2-Propylen)-dioxypropyl, Halogenniederalkyl, z.B. 2-Chlor- oder 2-Bromäthyl, einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen, z.B. Inosit, oder einen Steroidrest, z.B. ein Sterin, z.B. Cholesterin bedeuten, und ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl oder 2-Aminoäthyl bedeuten. Die wässrige Dispersion kann auch bevorzugt ein Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  Wasserstoff bedeuten, und gegebenenfalls ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl, 2-Aminoäthyl, Niederalkyl substituiert durch saure und basische Gruppen, z.B. Carboxy und Amino, z.B.  $\omega$ -Amino- $\omega$ -carboxyniederalkyl, z.B. 2-Amino-2-carboxyäthyl oder 3-Amino-3-carboxy-n-propyl, oder einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen bedeuten, z.B. Inosit oder ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, oder ein Sterin, z.B. Cholesterin, enthalten.

In erster Linie enthält die wässrige Dispersion eine Lysophosphatidsäure, z.B. eine natürliche Lysophosphatidsäure, z.B. Ei-Lysophosphatidsäure, oder eine synthetische Lysophosphatidsäure, z.B. 1-Lauroyl-, 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidsäure, ein Lysophosphatidylserin, z.B. ein natürliches Lysophosphatidylserin, z.B. Lysophosphatidylserin aus dem Rinderhirn, oder ein synthetisches Lysophosphatidylserin, z.B. 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidylserin, ein Lysophosphatidylglycerin oder ein Lysophosphatidylinositol und zusätzlich ein Lecithin, z.B. ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin, oder ein Lecithin mit gleichen Acyloxygruppen, z.B. Dimyristoyl- oder Dipalmitoyllecithin, ein Lecithin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, oder zusätzlich ein Kephalin, z.B. ein

natürliches Kephalin, z.B. Ei-Kephalin, oder ein Kephalin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoylkephalin.

In erster Linie kann die wässrige Dispersion auch eine natürliche Phosphatidsäure, z.B. Ei-Phosphatidsäure, eine synthetische Phosphatidsäure, z.B. Dilauroyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidsäure, und gegebenenfalls zusätzlich ein Lecithin, z.B. ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin, ein Lecithin mit gleichen Acyloxygruppen, z.B. Dimyristoyl- oder Dipalmitoyllecithin, oder ein Lecithin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, oder ein Kephalin, z.B. ein natürliches Kephalin, z.B. Ei-Kephalin oder ein Kephalin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoylkephalin, oder ein Phosphatidylserin, z.B. ein natürliches Phosphatidylserin, z.B. Phosphatidylserin aus dem Rinderhirn, oder ein synthetisches Phosphatidylserin, z.B. Dipalmitoylphosphatidylserin, ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, oder ein Sterin, z.B. Cholesterin, enthalten.

Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen stellt man zunächst eine homogene Schicht der Lipidkomponenten her. Die Herstellung der homogenen Schicht kann in an sich bekannter Weise erfolgen und ist weiter hinten im Abschnitt "Herstellung der homogenen Schicht der Lipidkomponenten" beschrieben.

Die homogene Schicht dispergiert man in wässriger Phase und erhöht anschliessend den pH-Wert von solchen wässrigen Phasen, worin nur eine Lipidkomponente, z.B. reine Phosphatidsäure, dispergiert ist, bis auf ca. 12, bevorzugt bis auf ca. 9 bis 11. Dies erfolgt beispielsweise durch Zugabe von physiologisch annehmbaren, basischen Lösungen, z.B. verdünnter wässriger, ca. 0,01 - 0,2 N, insbesondere ca. 0,1 N Natriumhydroxid- oder Kaliumhydroxid-Lösung, unter gleichzeitiger Kontrolle des pH-Werts. z.B. durch Tüpfelprobe oder ein pH-Meter. In wässrigen Phasen, worin mehrere Lipidkomponenten, z.B. Phosphatidsäure und Lecithin, dispergiert sind, reicht eine Erhöhung des pH-Werts auf



ca. 8-9 aus. Man kann diesen pH-Bereich ebenfalls durch Zugabe von wässrigen Basen, z.B. verdünnter Natronlauge oder Kalilauge, unter gleichzeitiger pH-Kontrolle oder durch Zugabe von Pufferlösung, z.B. Phosphatpufferlösung mit einem geeigneten pH-Wert von 7 bis 8, einstellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform dispergiert man die homogene Schicht der Lipidkomponenten in wässrigen Phasen mit einem pH-Wert grösser als 7, z.B. in physiologisch annehmbaren, basischen Lösungen, z.B. in verdünnter wässriger, ca. 0,01 - 0,2 N, insbesondere 0,1 N Natriumhydroxid- oder Kaliumhydroxid-Lösung. Eine Lipidkomponente, z.B. reine Phosphatidsäure, dispergiert man in wässrigen Phasen mit einem pH-Wert bis ca. 12, bevorzugt ca. 9 bis 11. Mehrere Lipidkomponenten, z.B. Phosphatidsäure und Lecithin, dispergiert man in wässrigen Phasen mit einem pH-Wert von ca. 8 bis 9.

#### Verfahren b)

Für ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist, einer der Reste  $R_1$  und  $R_2$  Wasserstoff, Hydroxy, Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und der andere Rest Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  durch eine Ammonio-Gruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, haben  $R_1$  und  $R_2$  die weiter vorn unter Verfahren a) genannten Bedeutungen.

Durch eine Ammonio-Gruppe substituiertes Niederalkyl  $R_4$  ist beispielsweise durch eine Triniederalkylammonio-Gruppe, z.B. Trimethyl- oder Triäthylammonio, substituiertes Niederalkyl, z.B. 2-Trimethyl- oder 2-Triäthylammonioäthyl.

Für ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist,  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  durch eine Ammonioniederalkylammonio-Gruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, haben  $R_1$  und  $R_2$  die weiter vorn unter Verfahren a) genannten Bedeutungen.

Durch eine Ammonioniederalkylammoniogruppe substituiertes Niederalkyl ist beispielsweise 2-[N,N-Diniederalkyl-N-(2-N',N',N'-triniederalkylammonioäthyl)-ammonio]-äthyl, z.B. 2-[N,N-Dimethyl-N-(2-N',N',N'-trimethylammonioäthyl)-ammonio]-äthyl.

Ein geeignetes zusätzliches Lipid ist eins der weiter vorn unter Verfahren a) genannten zusätzlichen Lipide.

Bevorzugt enthält die wässrige Dispersion ein Lipid der Formel A, worin m eins ist,  $R_1$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_2$  Hydroxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl bedeuten, und ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Aminoäthyl oder 2-Trimethylammonioäthyl bedeuten. Die wässrige Dispersion kann auch bevorzugt ein Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-[N,N-Dimethyl-N-(2-N',N',N'-trimethylammonioäthyl)-ammonio]-äthyl bedeuten und gegebenenfalls ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Aminoäthyl oder 2-Trimethylammonioäthyl bedeuten, enthalten.

In erster Linie enthält die wässrige Dispersion ein Lysophosphatidylcholin (Lysolecithin) und ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin. In erster Linie kann die wässrige Dispersion auch ein Phosphatidyl-2-[N,N-Dimethyl-N-(2-N',N',N'-trimethylammonioäthyl)-ammonio]-äthylchlorid und gegebenenfalls ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin, enthalten.

Zur Herstellung von unilamellaren Liposomen stellt man zunächst eine homogene Schicht der Lipidkomponenten, z.B. Lysolecithin oder Phosphatidyl-2-[N,N-Dimethyl-N-(2-N',N',N'-trimethylammonioäthyl)-ammonio]-äthylchlorid, her.

Die Herstellung der homogenen Schicht kann in an sich bekannter Weise erfolgen und ist weiter hinten im Abschnitt "Herstellung der homogenen Schicht der Lipidkomponenten" beschrieben.

Die homogene Schicht dispergiert man in wässriger Phase und erniedrigt anschliessend den pH-Wert bis auf ca. 1 oder darunter unter gleichzeitiger Kontrolle des pH-Werts, z.B. durch Tüpfelproben oder ein pH-Meter. Dies erfolgt beispielsweise durch Zugabe von physiologisch annehmbaren Säuren, beispielsweise verdünnten wässrigen Mineralsäuren, z.B. verdünnter wässriger Schwefelsäure, Salzsäure oder Phosphorsäure.

In einer bevorzugten Ausführungsform dispergiert man die homogene Schicht der Lipidkomponenten in wässrigen Phasen mit einem pH-Wert von ca. 1 oder Werten darunter, z.B. in verdünnten wässrigen Mineralsäuren, z.B. verdünnter wässriger Schwefelsäure, Salzsäure oder Phosphorsäure unter gleichzeitiger Kontrolle des pH-Werts.

Eine anschliessende Neutralisierung der wässrigen Phasen ist notwendig, wenn man zuvor den pH-Wert der wässrigen Phase gemäss Verfahren a) auf Werte höher als 8 oder gemäss Verfahren b) niedriger als 5 eingestellt hat. Dies erfolgt, um unmittelbar nach der pH-Wert Erniedrigung oder Erhöhung eine Zerstörung des Wirkstoffs und/oder der Liposomen unter basischen bzw. sauren Bedingungen zu vermeiden. Die basisch gemachte wässrige Phase neutralisiert man mit einer geeigneten physiologisch annehmbaren Säure oder einer Pufferlösung, z.B. Phosphatpufferlösung mit einem pH-Wert von 7 bis 8. Geeignete Säuren sind beispielsweise die weiter vorn genannten verdünnten wässrigen Mineralsäuren sowie schwache organische Säuren, z.B. Ameisensäure oder Essigsäure. Die saure wässrige Phase neutralisiert man durch Zugabe von wässrigen Basen, z.B. verdünnter wässriger Natrium- oder Kaliumhydroxid-Lösung. Man neutralisiert unter gleichzeitiger Kontrolle des pH-Werts.

Die Lipide sind in Konzentrationen bis über 70% in der wässrigen Phase dispergiert. Der Konzentrationsbereich von ca. 1% bis ca. 20% ist bevorzugt.

Man arbeitet zweckmässigerweise bei Raumtemperatur oder höheren Temperaturen, z.B. bis ca. 60°C. Falls es die Empfindlichkeit des zu verkapselnden Wirkstoffs verlangt, führt man das Verfahren unter Kühlen und gegebenenfalls in einer Inertgasatmosphäre, z.B. Stickstoffatmosphäre, durch.

Sowohl nach Verfahren a) als auch nach Verfahren b) findet die Bildung von unilamellaren Liposomen spontan (spontaneous vesiculation), d.h. ohne zusätzliche Energiezufuhr von aussen und mit grosser Geschwindigkeit, statt.

Die nach Verfahren a) und b) erhältlichen unilamellaren Liposomen sind in wässriger Phase relativ lange stabil. Beispielsweise bleiben unilamellare Liposomen bestehend aus Ei-Phosphatidsäure oder Ei-Phosphatidsäure und Ei-Lecithin in wässriger Phase bei 4°C gelagert mehr als 14 Tage lang stabil. Wässrige Phasen mit erfindungsgeäss herstellbaren unilamellaren Liposomen können nach den in der Europäischen Patentanmeldung O 065 292 angegebenen Verfahren lagerungsfähig gemacht werden.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen und ihr Gehalt in wässriger Phase lassen sich in an sich bekannter Weise anhand verschiedener Messmethoden, z.B. optisch im Elektronenmikroskop, durch Massenbestimmung in der analytischen Ultrazentrifuge und vor allem spektroskopisch, z.B. im Kernresonanzspektrum ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$ ), nachweisen. So geben beispielsweise scharfe Signale im Kernresonanzspektrum einen Hinweis auf erfolgte Bildung von kleinen unilamellaren Liposomen. Der Anteil an gebildeten kleinen unilamellaren Liposomen im System kann aus der Intensität der Signale berechnet werden. So ist im Protonen-Kernresonanzspektrum ein scharfes Methylen-signal bei  $\delta = 1,28$  ppm und ein scharfes Methyl-signal bei  $\delta = 0,89$  ppm für kleine unilamellare Liposomen, welche aus Phosphatidsäure gebildet werden, charakteristisch. Kleine unilamellare Liposomen, welche aus Phosphatidsäure und Lecithin bestehen, zeigen ebenfalls das Methylen- und das

Methylsignal bei  $\delta = 1,28$  und  $0,89$  ppm und zusätzlich ein Methylsignal bei  $\delta = 3,23$  ppm, welches der Trimethylammoniumgruppe des Lecithins zugeordnet wird.

Die Grösse der gebildeten unilamellaren Liposomen ist u.a. von der Struktur der Lipidkomponenten, dem Mischungsverhältnis der Lipidkomponenten, der Konzentration dieser Lipidkomponenten in der wässrigen Phase und von der Menge und Struktur des zu verkapselnden Wirkstoffs abhängig. So kann man beispielsweise durch Variation der Konzentration der Lipidkomponenten wässrige Phasen mit einem hohen Anteil an kleinen oder grossen unilamellaren Liposomen herstellen. Beispielsweise wird durch Zugabe von Ei-Phosphatidsäure zur dispersen Phase der Anteil an kleinen unilamellaren Liposomen (KUL) erhöht. Der Anteil von GUL in einer dispersen Phase lässt sich auch durch Zusatz von Salzen, z.B. NaCl oder KCl erhöhen. Der Durchmesser der beispielsweise aus Phosphatidsäure oder Phosphatidsäure und Lecithin gebildeten KUL beträgt ca.  $200 - 600 \text{ \AA}$ . Das Einschlussvolumen für KUL von dieser Grösse beträgt ca.  $0,5$  bis  $1 \text{ l}$  pro Mol eingesetzter Lipidkomponente.

Zusätzlich zu KUL entstehen auch grosse unilamellare Liposomen (GUL-Durchmesser bis zu  $50,000 \text{ \AA}$ ). Diese schliessen grössere Volumina pro Mol eingesetzter Lipidkomponenten ein und eignen sich zur Verkapselung mit höherer Ausbeute und zum Einschluss von voluminösen Materialien, z.B. Viren, Bakterien oder Zellorganellen.

Die Trennung der KUL von GUL erfolgt mittels herkömmlicher Trennmethoden, z.B. Gelfiltration, z.B. mit Sepharose 4B als Träger, oder durch Sedimentation der GUL in der Ultrazentrifuge bei  $160,000 \times g$ . Beispielsweise setzen sich nach mehrstündigem, ca. dreistündigem, Zentrifugieren in diesem Schwerfeld die GUL ab, während die KUL dispergiert bleiben und dekantiert werden können. Nach mehrmaligem Zentrifugieren erreicht man eine vollständige Trennung der GUL von KUL.

Auch durch Gelfiltration kann man alle in der wässrigen Phase befindlichen Liposomen mit einem Durchmesser grösser als 600 Å, z.B. GUL oder multilamellare Liposomen, sowie nicht verkapselte Wirkstoffe und überschüssige, dispergierte Lipide abtrennen und so eine wässrige Phase mit einer Fraktion KUL von relativ einheitlicher Grösse erhalten.

Die erfindungsgemäss erhältlichen Liposomen (KUL und GUL) sind geeignete Trägersysteme, welche in wässriger Phase zur Solubilisierung von lipophilen Stoffen, z.B. fettlöslichen Farbstoffen, zur Stabilisierung von hydrolyseempfindlichen Stoffen, z.B. Prostaglandinen, zum Einschluss von Schädlingsbekämpfungsmitteln, z.B. zur Veränderung des Wirkungsprofils von Dichlorphos, zum Einschluss von Nahrungsmittelzusätzen, z.B. zwecks Aenderung des Adsorptionsverhaltens von Vitaminen oder Farbstoffen, oder zur Einschleusung von verkapselten Wirkstoffen, Enzymen, Antikörpern, Hormonen, Genen, Viren, Vitaminen oder Zellorganellen in die Zellen einer Zellkultur verwendet werden können.

Wässrige Phasen, welche die erfindungsgemäss erhältlichen Liposome mit verkapselten Wirkstoffen enthalten, sind Verabreichungssysteme, welche sich, gegebenenfalls nach Konzentrierung oder Isolierung der Liposomen, z.B. durch Ultrazentrifugieren, zu therapeutischen Zwecken für die orale (p.o.), parenterale (i.v., i.m. oder i.p.) oder topikale Verabreichung eignen.

Bei oraler Verabreichung können Verabreichungssysteme auf Liposomenbasis einen Wirkstoff, beispielsweise Insulin, das im Verdauungstrakt unbeständig ist, schützen oder seine Resorption verbessern. Für die orale Verabreichung kann die Liposomen-haltige wässrige Phase mit pharmazeutisch unbedenklichen Verdünnungsmitteln oder Trägern oder mit üblichen Zusätzen, z.B. Farbstoffen oder Geschmacksstoffen, vermischt und als Sirup oder in Form von Kapseln verabreicht werden.

Bei parenteraler Verabreichung können Verabreichungssysteme auf Liposomenbasis beispielsweise die Verweilzeit z.B. von Desferrioxamin, siehe Guilmette R.A. et al., Life Sci. 22 (4) 313-320, 1978, oder Gentamycin, siehe Scheld W.M. et al., Clin. Res. 26, No. 1, 59 A, 1978, in einem Organismus verlängern. Ebenso wird die Verweilzeit von verkapselten Chelatbildern, z.B. EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), in Organismen verlängert, so dass man durch Chelatbildung Schwermetalle besonders aus Leber, Milz oder Nieren entfernen kann, siehe Rahmann et al., Science, Vol. 180, 300-302, 1973, und J. Lab. Clin. Med. 640-647, 1974. Mit Verabreichungssystemen auf Liposomenbasis kann man Wirkstoffe im Myokard anreichern, siehe Landesmann et al., Science Vol. 198, 737-738, 1977. Antiinflammatorisch wirkende Stoffe, z.B. Cortisol, siehe Nature 271, No. 5643, 372-73, 1978, oder Proteaseinhibitoren, siehe Anal. Biochem. 89, No. 2, 400-07, 1978, kann man in der Gelenkflüssigkeit und Cytostatika in Tumorgewebe, siehe Uebersichtsartikel von Kaye St. B., Cancer Treatment Reviews 8, 27-50, 1981, und die vielen darin zitierten Literaturstellen, anreichern. Manche Chemotherapeutika in der Krebstherapie sind weniger toxisch und besser verträglich, wenn sie in Liposomen verkapselt verabreicht werden, z.B. liposomverkapseltes Actinomycin D, siehe Rahman et al., Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 146, 1173-1176, 1974, Methotrexat, siehe Lesermann L.D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 77, No. 7, 4089-93, 1980, Vinblastin, Daunomycin oder Cytosin-Arabinosid, siehe Mühlensiepen et al., Cancer Res. 41, Nr. 5, 1602-07, 1981. Liposomen können zur Einschleusung von Wirkstoffen, z.B. Enzymen, Peptidhormonen, Genen oder Viren in das Cytoplasma von Zellen in lebenden Organismen, z.B. zur Einschleusung von Asparaginase, siehe Uebersichtsartikel von Finkelstein M. und Weissmann G., J. Lipid Research, Vol. 19, 1978, 289-303, von Amyloglucosidase, siehe Gregoriadis G. und Ryman B.E., Eur. J. Biochem. 24 (1972), 485-491, oder Neurominidase, siehe Gregoriadis et al., Biochem. J. (1974) 140, 232-330, zur Verankerung spezifischer Erkennungsmoleküle, z.B. monoklonaler Antikörper, zwecks zielgerichteter Einschleusung in definierte Zielzellen, siehe Leserman et al., Nature 293 (5829), 226-228, 1981, zur

Immunstimulation als Adjuvans bei Impfungen, z.B. gegen Leishmaniasen, siehe New R.R.C. et al. Nature 272 (5648) 55-56, 1978, oder zur induzierten Freisetzung von Wirkstoffen durch Signale wie Temperaturerhöhungen, z.B. in entzündetem Gewebe, oder pH-Wert Aenderungen verwendet werden. Für die parenterale Verabreichung können die konzentrierten oder isolierten Liposomen in einer geeigneten Trägerflüssigkeit, beispielsweise in sterilem destilliertem Wasser oder in physiologischer Kochsalzlösung, suspendiert werden.

#### Herstellung der homogenen Schicht der Lipidkomponenten

Die Herstellung der homogenen Schicht der Lipidkomponenten kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispielsweise löst man zunächst das Lipid oder Lipidgemisch der Formel A, z.B. reine Ei-Phosphatidsäure oder eine Mischung aus Ei-Phosphatidsäure und Ei-Lecithin, gegebenenfalls unter Zumischung eines lipophilen Wirkstoffs, z.B. Proteins, das bei der Bildung der Liposomen in der Lipidschicht, eingeschlossen wird, in einem organischen Lösungsmittel auf. Durch Entfernen des organischen Lösungsmittels, am zweckmässigsten im Vakuum oder durch Abblasen im Inertgas, z.B. Stickstoff, stellt man eine homogene Schicht der Lipidkomponenten her.

Die Auswahl des betreffenden Lösungsmittels ist von der Löslichkeit der betreffenden Lipidkomponenten darin abhängig. Geeignete Lösungsmittel sind beispielsweise unsubstituierte oder substituierte, z.B. halogenierte, aliphatische, cycloaliphatische, aromatische oder aromatisch-aliphatische Kohlenwasserstoffe, z.B. Benzol, Toluol, Methylenchlorid oder Chloroform, Alkohole, z.B. Methanol oder Aethanol, Niederalkancarbonsäureester, z.B. Essigsäureäthylester, Aether, z.B. Diäthyläther, Dioxan oder Tetrahydrofuran, oder Mischungen dieser Lösungsmittel.

Die in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung erwähnten Lipide sind bekannt oder können, falls sie neu sind, in an sich bekannter Weise nach den im Standardwerk von Knight C.G. Liposomes, Elsevier 1981, Kapi-



tel 3, befindlichen Vorschriften hergestellt werden. Alle genannten Lipide können in der wässrigen Dispersion als optisch aktive Derivate oder als Racemate enthalten sein. Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung, ohne sie zu beschränken. Temperaturen sind in Grad Celsius angegeben und Mischungsverhältnisse auf Volumina bezogen.

Beispiel 1:

a) Man löst 1 g Ei-Phosphatidsäure in 20 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum im Rotationsverdampfer ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 20 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 3 einstellt. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend zur dispersen Phase bei Raumtemperatur unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung, bis der pH-Wert auf 11 steigt. Der pH-Wert der wässrigen Phase wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N HCl von 11 bis auf ca. 7 gesenkt. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase.

Die gebildeten unilamellaren Liposomen können im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Liposomendispersion wird zunächst der üblichen Gefrierbruchmethode (freeze-fracture) unterzogen. Es liegen hauptsächlich zwei "Populationen" von unilamellaren Liposomen vor, die sich durch ihre durchschnittliche Grösse unterscheiden:

1. Kleine unilamellare Liposomen (KUL) mit einem Durchmesser von ca. 200-600 Å und
2. Grosse unilamellare Liposomen (GUL) mit einem Durchmesser von ca. 1,000 - 10,000 Å.

KUL sind im Protonen-NMR-Spektrum durch die Signale  $\delta = 1,28$  (Methylen) und  $\delta = 0,89$  ppm (Methyl) erkennbar. Die Ausbeute an KUL kann aus den Intensitäten der Signale abgeschätzt werden und beträgt ca. 56 %.

b) Analog Beispiel 1a) löst man 4 mal je 10 mg Ei-Phosphatidsäure in 4 mal je 0,2 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch 5 Minuten langes

Schütteln. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend zu jeder einzelnen dispersen Phase unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung bis ein pH-Endwert von jeweils 6, 8, 11,3 und 11,6 resultiert. Die Ausbeute an KUL beträgt mit ansteigendem pH-Wert für jede Probe 5, 24, 57 und 60 %.

#### Beispiel 2:

a) Man löst 1 g Ei-Phosphatidsäure in 20 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 50 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt ca. 100 %.

b) Analog Beispiel 2a) löst man 4 mal je 10 mg Ei-Phosphatidsäure in 4 mal je 0,2 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jede Probe in soviel 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung und destilliertem Wasser unter Schütteln, dass sich pH-Werte von ca. 7,3, 8,0, 9,4 und 10,0 einstellen. Die Ausbeute an KUL beträgt mit ansteigendem pH-Wert für jede Probe 33, 46, 65 und 81 %.

#### Beispiel 3:

Man löst 0,1 g Dilauroylphosphatidsäure in 5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 50 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL (ca. 300 - 800 Å) beträgt 73 %.

Beispiel 4:

a) Man löst 3 mg Ei-Phosphatidsäure und 7 mg Ei-Lecithin in 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln bei Raumtemperatur, worauf sich ein pH-Wert von ca. 3 einstellt. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend bei Raumtemperatur unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 Natronlauge, bis der pH-Wert auf ca. 11,2 steigt. Durch Zugabe von Phosphatpufferlösung stellt man anschliessend den pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 ein. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase. Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen ist im NMR-Spektrum durch die Signale  $\delta = 1,28$  (Methylen),  $\delta = 0,89$  (Methyl) und  $\delta = 3,23$  (N-CH<sub>3</sub>) erkennbar. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind hauptsächlich zwei "Populationen" von unilamellaren Liposomen zu erkennen, die sich durch ihre durchschnittliche Grösse unterscheiden:

1. KUL mit einem Durchmesser von ca. 200 - 800 Å und
2. GUL mit einem Durchmesser von ca. 1000 - 10,000 Å.

Die Ausbeute an KUL beträgt 45 %.

b) Analog Beispiel 4a) löst man 2 mal je 3 mg Ei-Phosphatidsäure und 7 mg Ei-Lecithin in 2 mal je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den filmartigen Rückstand in 1,0 ml destilliertem Wasser durch 5 Minuten langes Schütteln. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend zu jeder einzelnen Phase unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, bis ein Endwert von 8,6 und 10 eingestellt ist. Die Ausbeute an KUL beträgt mit ansteigendem pH-Wert 22 und 35 %.

c) Analog Beispiel 4a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure und Ei-Lecithin in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den filmartigen Rückstand in 1,0 ml destilliertem Wasser durch 5 Minuten langes Schütteln. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend zu jeder einzelnen Phase unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, bis sich ein pH-Wert von ca. 11,2 eingestellt hat. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	6	10	14	20	25	30	33	50	48	60
%-KUL	5	9	14	17	19	20	27	39	41	50

#### Beispiel 5:

a) Man löst 0,3 g Ei-Phosphatidsäure und 0,7 g Ei-Lecithin in 10 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert diesen Rückstand in 10 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt ca. 30 %.

b) Analog Beispiel 5a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidlösung und Ei-Lecithin (insgesamt 10 mg Lipid) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den filmartigen Rückstand in je 1 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	10	20	25	30	40	50	60	80
%-KUL	14	22	31	42	45	50	78	95

Beispiel 6:

a) Man löst 0,7 g Ei-Lecithin, 0,3 g Phosphatidylserin aus dem Rinderhirn und 2 g Ei-Phosphatidsäure in 20 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum im Rotationsverdampfer ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 100 ml 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung durch fünf Minuten langes Schütteln bei Raumtemperatur, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Durch Zugabe von 1 N Salzsäure wird der pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 eingestellt. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind GUL und KUL zu erkennen.

b) Analog Beispiel 6a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure, aber gleicher Menge an Ei-Lecithin und Phosphatidylserin (insgesamt 10 mg Lipid) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den Rückstand in je 1,0 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	9	10	26	33	34	40	60
%-KUL	14	18	26	36	47	43	64

Beispiel 7:

a) Man löst 1 g Asolectin (Phospholipidgemisch hauptsächlich bestehend aus Lecithin, Kephalin, Phosphatidylserin und Phosphatidylinosit) und 0,2 g Ei-Phosphatidsäure in 20 ml einer Chloroform/Methanol

Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 100 ml 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung durch fünf Minuten langes Schütteln bei Raumtemperatur, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Durch Zugabe von 1 N Salzsäure wird der pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 gebracht. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind GUL und KUL zu erkennen.

b) Analog zu Beispiel 6a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure, aber gleicher Menge an Asolectin (insgesamt 10 mg Lipid) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den Rückstand in je 1 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	17	37	50
%-KUL	24	69	65

#### Beispiel 8:

a) Man löst 0,1 g einer Mischung aus Ei-Lecithin und Cholesterin (Molverhältnis 1:1) und 0,1 g Ei-Phosphatidsäure in 10 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 10 ml 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung durch fünf Minuten langes Schütteln bei Raumtemperatur, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Durch Zugabe von 1N Salzsäure wird der pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 gebracht. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop angewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind GUL und KUL zu erkennen.

b) Analog Beispiel 8a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure, aber gleicher Menge an Ei-Lecithin und Cholesterin (insgesamt 10 mg Lipid) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den Rückstand in je 1,0 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	10	30	50	80
%-KUL	4	10	20	50

#### Beispiel 9:

Man löst 0,5 g Ei-Phosphatidsäure und 0,5 g Dimyristoyllecithin in 10 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 50 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt 36 %.

#### Beispiel 10:

Man stellt analog Beispiel 9 Liposomengemische bestehend aus 0,5 g Ei-Phosphatidsäure und jeweils 0,5 g Dipalmitoyllecithin oder Distearoyllecithin her. Die Ausbeute an KUL beträgt 10 %.

Beispiel 11:

Man stellt analog Beispiel 9 ein Liposomengemisch bestehend aus 0,5 g Dipalmitoylphosphatidsäure und 0,5 g Ei-Lecithin her. Die Ausbeute an KUL beträgt 10 %.

Beispiel 12:

Man löst 5 mg Lysolecithin und 5 mg Ei-Lecithin in 1 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 5 - 7 einstellt. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man anschliessend zur wässrigen Dispersion bei Raumtemperatur unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N Salzsäure, bis der pH-Wert der wässrigen Phase auf 0,5 abgesunken ist. Durch Zugabe von 0,1 N Natriumhydroxidlösung erhöht man anschliessend den pH-Wert auf 7.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind KUL und GUL zu erkennen. Die Ausbeute an KUL beträgt 50 %.

Beispiel 13:

Man stellt analog Beispiel 12 ein Liposomengemisch bestehend aus 5 mg Phosphatidyl-2-[N,N-dimethyl-N-(2-N',N',N'-trimethylammonioäthyl)-ammonio]-äthylchlorid, dessen Herstellung in Knight C.G., Liposomes, Elsevier 1981, Kapitel 3, beschrieben ist, und 5 mg Ei-Lecithin her.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind KUL mit einem Durchmesser von 250 Å und GUL mit einem Durchmesser von ca. 600 - >10,000 Å zu erkennen. Die Ausbeute an KUL beträgt 50 %.



Beispiel 14:

Man löst 5 mg (6,67 mM) Ei-Lecithin und 5 mg (9,5 mM) natürliches Lysophosphatidylglycerin in 1 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum im Rotationsverdampfer ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 5 einstellt. Anschliessend wird der pH-Wert der wässrigen Dispersion mit 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung unter Kontrolle mit einem pH-Meter auf ca. 8 eingestellt.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind KUL und GUL zu erkennen. Die Ausbeute an KUL beträgt ca. 35 %.

Beispiel 15:

Man löst 6 mg (8,00 mM) Ei-Lecithin und 4 mg (8,0 mM) natürliches Lysophosphatidylserin in 1 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum im Rotationsverdampfer ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 6 einstellt. Anschliessend wird der pH-Wert der wässrigen Dispersion mit 0,1 N-Natriumhydroxid-Lösung unter Kontrolle mit einem pH-Meter auf ca. 8 eingestellt.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind KUL und GUL zu erkennen. Die Ausbeute an KUL beträgt ca. 20 %.

Beispiel 16:

Man löst 5 mg (6,67 mM) Ei-Lecithin und 5 mg (10,0 mM) Lysophosphatidylinositol in 1 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum im Rotationsverdampfer ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser durch fünf Minuten langes Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 6 einstellt. Anschliessend wird der pH-Wert der wässrigen Dispersion mit 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung unter Kontrolle mit einem pH-Meter auf ca. 7 eingestellt.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind KUL und GUL zu erkennen. Die Ausbeute an KUL beträgt ca. 40 %.

Beispiel 17:

a) Man löst 0,5 g Monoolein (9-cis-Octadecenoylglycerol) und 0,5 g Ei-Phosphatidsäure in 20 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung im Vakuum ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 100 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung durch fünf Minuten langes Schütteln bei Raumtemperatur, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Durch Zugabe von 1 N Salzsäure wird der pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 gebracht. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase.

Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind GUL und KUL zu erkennen.

b) Analog Beispiel 17a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure und an Monoolein (totale Lipidmenge = 10 mg) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den Rückstand in je 1 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	20	30	50	80
%-KUL	10	17	26	45

#### Beispiel 18:

Analog Beispiel 17a) löst man Proben unterschiedlichen Gehalts an Ei-Phosphatidsäure und Monomyristin (gesamte Lipidmenge: 10 mg) in je 0,5 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösungen im Vakuum ein. Man dispergiert jeweils den Rückstand in je 1 ml einer 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter Schütteln, wobei sich ein pH-Wert von ca. 12 einstellt. Der pH-Wert der wässrigen Dispersion wird anschliessend durch Zugabe von 0,1 N Salzsäure auf ca. 7 bis 8 gesenkt. Die Ausbeute an KUL beträgt für jede Probe mit steigendem Ei-Phosphatidsäuregehalt:

%-Ei-Phosphatidsäure	30	50	80
%-KUL	9	18	38

#### Beispiel 19:

a) Man stellt analog Beispiel 1a) und 1b) ein Liposomengemisch bestehend aus Ei-Phosphatidsäure her, wobei man eine Ausbeute bis zu 66 % KUL erhält. Um den Anteil an GUL im Liposomengemisch zu erhöhen, setzt man zur dispersen Phase, welche frisch hergestellt unilamellare Liposomen enthält, 0,5 molare Kochsalzlösung hinzu. Mit zu-

nehmender NaCl-Konzentration in der dispersen Phase sinkt der Anteil an KUL:

[NaCl] in Mol/l	0	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,75	0,95
%-KUL	66	64	50	40	30	23	15	11

b) Um den Anteil an GUL im Liposomengemisch zu erhöhen, setzt man zur dispersen Phase, welche frisch hergestellte unilamellare Liposomen bestehend aus reiner Ei-Phosphatidsäure enthält, 0,5 molare Kaliumchloridlösung hinzu. Mit zunehmender KCl-Konzentration in der dispersen Phase sinkt der Anteil an KUL:

[KCl] in Mol/l	0	0,2	0,4	0,5	0,63
%-KUL	66	63	50	50	36

#### Beispiel 20:

Man löst 40 mg Dipalmitoylphosphatidylcholin und 20 mg Ei-Phosphatidsäure in 5 ml reinem tert.-Butanol bei 60°. Durch Eintauchen des Kolbens in eine Kältemischung aus Methanol-Trockeneis friert man die Lösung ein. Man entfernt das tert.-Butanol in einem Gefriertrockner und erhält so einen homogenen Schaum von Lipiden. Anschliessend dispergiert man in Wasser durch heftiges Schütteln. Zur Bildung von unilamellaren Liposomen gibt man bei Raumtemperatur unter Kontrolle mit einem pH-Meter soviel 0,1 N-Natronlauge, bis der pH-Wert auf ca. 8 ansteigt. Durch Zugabe von Phosphatpufferlösung stellt man anschliessend den pH-Wert der wässrigen Phase auf ca. 7 ein. Man erhält eine leicht opaleszierende, wässrige Phase. Die gebildeten Liposomen sind im Elektronenmikroskop erkennbar und haben einen Durchmesser von 200 - 10,000 Å.

Beispiel 21:

Man löst 3,0 mg eines in der Tabelle genannten Lipids und 7,0 mg Ei-Lecithin in 1 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) und dampft diese Lösung ein. Man dispergiert den filmartigen Rückstand in 1 ml destilliertem Wasser, wobei sich ein pH-Wert von ca. 6-10 einstellt. Anschliessend erhöht man den pH-Wert der wässrigen Phase durch Zugabe von 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung auf ca. 8. Die erfolgte Bildung von unilamellaren Liposomen kann analog Beispiel 1a) spektroskopisch, z.B. im NMR-Spektrum, oder im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. In der elektronenmikroskopischen Abbildung sind GUL und KUL zu erkennen. Die Ausbeute an KUL ist in der Tabelle angegeben:

Tabelle:

Lipid	Konzentration des Lipids [mM/l]	Ausbeute [% KUL]
2-Hydroxyäthyl-3-palmitoyloxyphosphat	6,52	40
2-Methyl-2-palmitoyloxypropylhydrogenphosphat	6,76	60
3-Cetyloxypropyl-2-hydroxyäthylphosphat	6,73	35
2-Bromäthyl-cetylphosphat	6,63	55
n-Eicosyl-2,3-(2,2-propylen)-dioxypylphosphat	5,84	40
3-Stearoyloxypropylhydrogenphosphat	5,98	55
2,3-Dihydroxypropyl-myristylphosphat	7,69	40
3-Cetyloxypropylhydrogenphosphat	7,46	20
2,3-Dihydroxypropyl-n-eicosylphosphat	6,33	7
Cholesteryl-2,3-dihydroxypropylphosphat	5,18	70
Cetyl-2,3-dihydroxypropylphosphat	7,18	20
Aethyl-3-stearoyloxypropylphosphat	6,36	40

Beispiel 22:

Analog Beispiel 1-20 kann man unilamellare Liposomen aus Myristinsäure und Ei-Lecithin, Myristinsäure und Ei-Kephalin, Oelsäure und Ei-Lecithin, Oelsäure und Ei-Kephalin, Dimyristoylphosphatidsäure und Dimyristoyllecithin, Dipalmitoylphosphatidsäure und 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidsäure und Dipalmitoyllecithin, 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidsäure und 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, Ei-Lysophosphatidsäure und Ei-Lecithin, 1-Myristoyllysophosphatidsäure und 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, 1-Palmitoyllysophosphatidsäure und 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, Lysophosphatidylserin aus dem Rinderhin und Ei-Lecithin, 1-Palmitoyllysophosphatidylserin, 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylserin und 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin und Lysophosphatidylserin aus dem Rinderhirn und Ei-Kephalin herstellen.

Beispiel 23:

2 mg Hydrocortison-21-palmitat, 40 g Ei-Lecithin und 20 mg Ei-phosphatidsäure werden in 5 ml tert.-Butanol gelöst, durch ein 0,2 µm-Filter sterilfiltriert, in eine 25 ml Vialle gefüllt, durch Eintauchen der Vialle in eine Trockeneis/Aethanol-Kältemischung gefroren und lyophilisiert. Man versetzt den entstandenen Schaum mit 5 ml sterilem destilliertem Wasser und dispergiert durch 10 Minuten langes Schütteln. Durch Zugabe von 0,1 N sterilfiltrierter Natronlauge bringt man den pH-Wert auf 10,5 und lässt eine Minute lang stehen. Anschliessend setzt man 0,5 ml eines 10-fachen Konzentrates von phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung von pH 7,4 (PBS für Injektionszwecke) zu. Die so erhaltene Dispersion von unilamellaren Liposomen eignen sich zur Injektion in entzündlich veränderten Gelenkkapseln.

Beispiel 24:

0,1 mg N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-äthylamid, 7 mg chromatographisch gereinigtes Lecithin aus dem Hühnereiweiss und 3 mg Ei-Phosphatidsäure

werden in 2 ml einer Chloroform/Methanol Mischung (2:1) gelöst und im Vakuum eingedampft. Es bleibt ein klarer Lipidfilm zurück. Man dispergiert diesen Film durch Zugabe von 2 ml sterilem destilliertem Wasser unter Umschwenken und setzt einen Tropfen 0,1 %-iger Thymolphthalein-Lösung hinzu. Zur Dispersion gibt man bis zum Farbumschlag 0,1 N Natronlauge, worauf spontane Bildung von unilamellaren Liposomen erfolgt. Man puffert anschliessend sofort durch Zugabe von 0,2 ml eines 10-fachen Konzentrats von phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung (PBS für Injektionszwecke) den pH-Wert auf 7,4 ab.

Die entstandene Dispersion eignen sich direkt zur Aktivierung von alveolären Makrophagen in Zellkulturen oder in vivo in der Ratte.

#### Beispiel 25:

0,15 g N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-äthylamid, 27 g Ei-Lecithin mit 97 % Phosphatidylcholingehalt und 3 g Ei-Phosphatidsäure werden in einer Mischung von 200 ml Chloroform und 20 ml Methanol gelöst, mit 200 ml tert.-Butanol aufgefüllt und auf 180 ml eingeengt. Die Lösung wird mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert, in einer Äthanol/Trockeneis Mischung rasch gefroren und anschliessend gefriergetrocknet. Das durch Mahlung zerkleinerte Lyophilisat wird in 300 ml steril hergestellte 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung unter kräftigem Rühren eingetragen. Nach vollständiger Dispersion wird die wässrige Phase durch Zugabe von 0,1 n HCl neutralisiert. Die erhaltene opaleszierende Dispersion wird in eine gerührte Ultrafiltrationszelle (Amicon<sup>®</sup>), eingefüllt, die anstelle des Ultrafilters mit einem geradporigen Filter aus Polcarbonat (Nucelopore<sup>®</sup>) mit einem Porendurchmesser von 0,1 µm versehen ist und partikelfrei gewaschen wurde, und unter geringem Ueberdruck und stetiger Zufuhr von sterilfiltrierter Pufferlösung nach Dulbecco (pH 7,4 ohne Ca und Mg) so filtriert, dass das Volumen in der Zelle nicht unter 300 ml sinkt. Nach Durchtritt von 3 l Filtrat sind alle GUL abgetrennt und die überstehende Dispersion an GUL kann ampulliert und für Behandlungsversuche eingesetzt werden.

Beispiel 26:

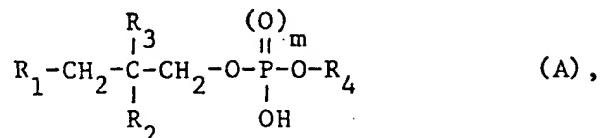
15 mg N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-di-palmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoryl)-äthylamid, 0,6 g reines Ei-Lecithin und 2,4 g Ei-Phosphatidsäure werden in einer Mischung von 20 ml Chloroform und 2 ml Methanol gelöst, durch ein 0,2 µm-Filter sterilfiltriert und an einem partikelfrei gewaschenen, über Sterilfilter entlüfteten Rotationsverdampfer in einem 500 ml Rundkolben so eingedampft, dass die Lipidmischung als möglichst gleichmässiger Film auf der Kolbenwand trocknet. Nach Trocknung des Rückstands über Nacht im Hochvakuum werden 30 ml steril hergestellte 0,01 N Natriumhydroxid-Lösung zugegeben, der Kolben verschlossen und 5 Minuten lang geschüttelt. Die entstandene opaleszierende wässrige Phase wird durch Zugabe von steriler 0,1 N Salzsäure auf pH 7,4 gestellt. Nach Einfüllen in eine gerührte Filterzelle (Totalvolumen 100 ml) gemäss Beispiel 23 wird unter Zugabe von sterilem, partikelfrei filtriertem Wasser so lange filtriert, bis 500 ml Filtrat gesammelt sind. Dieses Filtrat wird in eine gerührte Filterzelle, die mit einem Ultrafilter, z.B. Amicon U 10<sup>®</sup>, bestückt ist, kontinuierlich eingespeist und auf ein Volumen von 30 ml konzentriert. Die konzentrierte Dispersion enthält kleine, unilamellare Liposomen und kann nach Zugabe eines Konzentrats von Phosphatpuffer nach Dulbecco (pH 7,4 ohne Ca und Mg) ampulliert und für Behandlungsversuche eingesetzt werden.



Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von unilamellaren Liposomen, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) ein Lipid der Formel



worin m null oder ein ist, einer der Reste  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Wasserstoff, Hydroxy, Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und der andere Rest Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $\text{R}_3$  Wasserstoff oder Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und  $\text{R}_4$  Wasserstoff, Niederalkyl mit 1-7 C-Atomen, einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen oder, wenn  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Wasserstoff oder Hydroxy und  $\text{R}_3$  Wasserstoff bedeuten, einen Steroidrest bedeuten, und ein geeignetes zusätzliches Lipid und/oder eine Fettsäure und ein geeignetes zusätzliches Lipid mit Ausnahme eines Sterins oder

ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist,  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $\text{R}_3$  und  $\text{R}_4$  Wasserstoff bedeuten und gegebenenfalls ein geeignetes zusätzliches Lipid in wässriger Phase mit einem pH-Wert grösser als 7 dispergiert, oder

b) ein Lipid der Formel A, worin m null oder eins ist, einer der Reste  $\text{R}_1$  und  $\text{R}_2$  Wasserstoff, Hydroxy, Niederalkyl mit 1-4 C-Atomen und der andere Rest Alkyl, Alkenyl, Alkoxy oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $\text{R}_3$  Wasserstoff und  $\text{R}_4$  durch eine Ammoniogruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, und gegebenenfalls ein geeignetes zusätzliches Lipid oder

ein Lipid der Formel A, worin  $m$  null oder eins ist,  $R_1$  und  $R_2$  unabhängig voneinander Alkyl, Alkenyl oder Alkenyloxy mit je 10-20 C-Atomen oder Acyloxy mit 10-50 C-Atomen,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  durch eine Ammonioniederalkylammoniogruppe substituiertes Niederalkyl bedeuten, und ein geeignetes zusätzliches Lipid in wässriger Phase mit einem pH-Wert kleiner als 7 dispergiert, und, wenn notwendig, die wässrige Phase neutralisiert und, wenn erwünscht, die erhältlichen unilamellaren Liposomen anreichert und/oder abtrennt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion ein Lipid der Formel A, worin  $m$  eins ist,  $R_1$  Alkyl, z.B. n-Dodecyl (Lauryl), n-Tridecyl, n-Tetradecyl (Myristyl), n-Pentadecyl, n-Hexadecyl (Cetyl), n-Heptadecyl oder n-Octadecyl (Stearyl), Alkoxy, z.B. n-Dodecyloxy (Lauryloxy), n-Tetradecyloxy (Myristyloxy), n-Hexadecyloxy (Cetyloxy), oder n-Octadecyloxy (Stearylloxy), Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_2$  Wasserstoff oder Hydroxy,  $R_3$  Wasserstoff oder Niederalkyl, z.B. Methyl, und  $R_4$  Wasserstoff, Niederalkyl, z.B. Methyl oder Äthyl, Niederalkyl substituiert durch saure und basische Gruppen, z.B. Carboxy und Amino, z.B.  $\omega$ -Amino- $\omega$ -carboxy-niederalkyl, z.B. 2-Amino-2-carboxyäthyl oder 3-Amino-3-carboxy-n-propyl, Hydroxyniederalkyl, z.B. 2-Hydroxyäthyl oder 2,3-Hydroxypropyl, Niederalkylendioxyniederalkyl, z.B. 2,3-Aethylendioxypentyl oder 2,3-(2,2-Propylen)-dioxypentyl, Halogenniederalkyl, z.B. 2-Chlor- oder 2-Bromäthyl, einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen, z.B. Inosit, oder einen Steroidrest, z.B. ein Sterin, z.B. Cholesterin bedeuten, und ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl oder 2-Aminoäthyl bedeuten, enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion ein Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyloxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,

$R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  Wasserstoff bedeuten, und gegebenenfalls ein zusätzliches Lipid der Formel A, worin  $R_1$  und  $R_2$  Acyloxy, z.B. Lauroyl-oxy, Myristoyloxy, Palmitoyloxy oder Stearoyloxy,  $R_3$  Wasserstoff und  $R_4$  2-Trimethylammonioäthyl, 2-Aminoäthyl, Niederalkyl substituiert durch saure und basische Gruppen, z.B. Carboxy und Amino, z.B.  $\omega$ -Amino- $\omega$ -carboxyniederalkyl, z.B. 2-Amino-2-carboxyäthyl oder 3-Amino-3-carboxy-n-propyl, oder einen Kohlehydratrest mit 5-12 C-Atomen bedeuten, z.B. Inosil, oder ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, oder ein Stearin, z.B. Cholesterin, enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion eine Lysophosphaatidsäure, z.B. eine natürliche Lysophosphatidsäure, z.B. Ei-Lysophosphatidsäure, oder eine synthetische Lysophosphatidsäure, z.B. 1-Lauroyl-, 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidsäure, ein Lysophosphatidylserin, z.B. ein natürliches Lysophosphatidylserin, z.B. Lysophosphatidylserin aus dem Rinderhirn, oder ein synthetisches Lysophosphatidylserin, z.B. 1-Myristoyl- oder 1-Palmitoyllysophosphatidylserin, ein Lysophosphatidylglycerin oder ein Lysophosphatidylinositol und zusätzlich ein Lecithin, z.B. ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin, oder ein Lecithin mit gleichen Acyloxygruppen, z.B. Dimyristoyl- oder Dipalmitoyllecithin, ein Lecithin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, oder zusätzlich ein Kephalin, z.B. ein natürliches Kephalin, z.B. Ei-Kephalin, oder ein Kephalin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoylkephalin.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion eine natürliche Phosphatidsäure, z.B. Ei-Phosphatidsäure, eine synthetische Phosphatidsäure, z.B. Dilauroyl-, Dimyristoyl-, Dipalmitoyl- oder 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidsäure, und gegebenenfalls zusätzlich ein Lecithin, z.B. ein natürliches Lecithin, z.B. Ei-Lecithin, ein Lecithin mit gleichen Acyloxygruppen, z.B. Dimyristoyl- oder Dipalmitoyllecithin, oder ein Lecithin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoyllecithin, oder ein Kephalin, z.B. ein natürliches Kephalin, z.B.

Ei-Kephalin oder ein Kephalin mit verschiedenen Acyloxygruppen, z.B. 1-Palmitoyl-2-oleoylkephalin, oder ein Phosphatidylserin, z.B. ein natürliches Phosphatidylserin, z.B. Phosphatidylserin aus dem Rinderhirn, oder ein synthetisches Phosphatidylserin, z.B. Dipalmitoylphosphatidylserin, ein Monoglycerid, z.B. Monoolein oder Monomyristin, oder ein Sterin, z.B. Cholesterin, enthält.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion Ei-Phosphatidsäure oder Ei-Phosphatidsäure und Ei-Lecithin enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion Ei-Phosphatidsäure, Ei-Lecithin oder Phosphatidylserin aus dem Rinderhirn enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion Asolectin enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion Ei-Phosphatidsäure, Ei-Lecithin und Cholesterin enthält.

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion Lysolecithin und Ei-Lecithin enthält.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Dispersion natürliches Lysophosphatidylserin und Ei-Lecithin enthält.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine homogene Schicht der unter Verfahren a) genannten Lipide in wässriger Phase dispergiert und anschliessend den pH-Wert bis auf ca. 12 erhöht.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man den pH-Wert durch Zugabe von verdünnter wässriger Natriumhydroxid- oder Kaliumhydroxid-Lösung erhöht.

14. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass man eine homogene Schicht der unter Verfahren a) genannten Lipide in wässrigen Phasen mit einem pH-Wert grösser als 7 dispergiert.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass man eine homogene Schicht der unter Verfahren a) genannten Lipide in verdünnter, wässriger Natriumhydroxid- oder Kaliumhydroxid-Lösung dispergiert.
16. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine homogene Schicht der unter Verfahren b) genannten Lipide in wässriger Phase mit einem pH von ca. 1 dispergiert.
17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die wässrige Phase anschliessend durch Zugabe von physiologisch annehmbaren Säuren, Basen oder Pufferlösung mit einem pH 7-8 neutralisiert.
18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass man eine solche wässrige Phase durch Zugabe von physiologisch annehmbaren Säuren oder Pufferlösung mit einem pH 7-8 neutralisiert, die man zuvor auf Werte höher als pH 8 eingestellt hat.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man die wässrige Phase durch Zugabe von Salzsäure neutralisiert.
20. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine solche wässrige Phase durch Zugabe von physiologisch annehmbaren Basen neutralisiert, die man zuvor auf Werte niedriger als pH 5 eingestellt hat.
21. Die nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 erhältlichen unilamellaren Liposomen.
22. Verabreichungssystem auf Liposomenbasis für verkapselte Wirkstoffe, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Patentanspruch 1.

23. Verabreichungssystem auf Liposomenbasis für verkapseltes N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanyl-2-(1',2'-dipalmitoyl-sn-glycero-3'-phosphoro)-äthylamid, hergestellt nach den Verfahren gemäss Patentanspruch 1.
24. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Verabreichungssystem auf Liposomenbasis für verkapselte Wirkstoffe gemäss Anspruch 18, vermischt mit pharmazeutisch verträglichen Zusatzstoffen.
25. Verabreichungssystem gemäss Anspruch 22 zur Anwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.
26. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäss Anspruch 22 zur Anwendung bei der Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.
27. Die Methode der Behandlung von Erkrankungen des menschlichen oder tierischen Körpers mit Verabreichungssystemen gemäss Anspruch 22.



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

SCIENCE REFERENCE LIBRARY

⑪ Veröffentlichungsnummer:

**0 088 046  
A3**

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: 83810060.0

⑤① Int. Cl.<sup>3</sup>: **A 61 K 9/50**

⑳ Anmeldetag: 11.02.83

③① Priorität: 17.02.82 CH 981/82  
17.01.83 CH 237/83

⑦① Anmelder: CIBA-GEIGY AG, Patentabteilung Postfach,  
CH-4002 Basel (CH)

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 07.09.83  
Patentblatt 83/36

⑧④ Benannte Vertragsstaaten: AT BE CH DE FR GB IT LI LU  
NL SE

⑧⑧ Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 08.02.84 Patentblatt 84/6

⑦② Erfinder: Hauser, Helmut, Dr., Schwarzbachstrasse 91,  
CH-8713 Uerikon (CH)

⑤④ **Lipide in wässriger Phase.**

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues, vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung von unilamellaren Liposomen in wässriger Phase durch Überführen einer geeigneten Lipidkomponente, z.B. Phosphatidsäure, in die ionische Form, indem man die Lipiddispersion einer pH-Änderung unterwirft und anschließend neutralisiert. Die Bildung der unilamellaren Liposome erfolgt spontan d.h. ohne zusätzliche äußere Energiezufuhr. Die verfahrensgemäß erhältlichen Liposome können als Träger von Wirkstoffen unterschiedlichster Art therapeutisch verwendet werden.

**EP 0 088 046 A3**



Europäisches  
Patentamt

**EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,**  
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-  
übereinkommens für das weitere Verfahren als  
europäischer Recherchenbericht gilt

0088046

Nummer der Anmeldung  
EP 83 81 0060

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE																	
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 3)														
D,A	<u>US - A - 4 053 585 (A.C. ALLISON)</u>  * Spalte 1, Zeilen 38-42; Spalte 2, Zeilen 3-7, Zeilen 42-54; Beispiel 1, Zeile 59 - Spalte 3, Zeile 5; Ansprüche 1,2 *	1-26	A 61 K 9/50														
--																	
A	<u>EP - A - 0 004 223 (D. PAPAHDJO POULOS)</u>  * Seite 6, Zeile 25 - Seite 8, Zeile 4; Beispiel 1; Seite 19, Zeile 36 - Seite 20, Zeile 5 *	1-26															
--																	
D,A	<u>DE - A - 2 902 672 (SANDOZ)</u>  * Seite 5, Zeile 7 - Seite 8, Zeile 21; Seite 10, Zeilen 10-17; Beispiel 1, Zeile 2 - Seite 12, ./.	1-26															
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 3)														
			A 61 K 9/00														
<b>UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE</b>																	
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-26 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: 27 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (siehe Artikel 52 (4) des Europäischen Patentübereinkommens).</p>																	
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 06-10-1983	Prüfer BERTE														
<table border="0"><tr><td><b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b></td><td><b>E</b> : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</td></tr><tr><td><b>X</b> : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</td><td><b>D</b> : in der Anmeldung angeführtes Dokument</td></tr><tr><td><b>Y</b> : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</td><td><b>L</b> : aus andern Gründen angeführtes Dokument</td></tr><tr><td><b>A</b> : technologischer Hintergrund</td><td></td></tr><tr><td><b>O</b> : nichtschriftliche Offenbarung</td><td></td></tr><tr><td><b>P</b> : Zwischenliteratur</td><td></td></tr><tr><td><b>T</b> : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</td><td><b>&amp;</b> : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td></tr></table>				<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b>	<b>E</b> : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist	<b>X</b> : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	<b>D</b> : in der Anmeldung angeführtes Dokument	<b>Y</b> : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	<b>L</b> : aus andern Gründen angeführtes Dokument	<b>A</b> : technologischer Hintergrund		<b>O</b> : nichtschriftliche Offenbarung		<b>P</b> : Zwischenliteratur		<b>T</b> : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	<b>&amp;</b> : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
<b>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</b>	<b>E</b> : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist																
<b>X</b> : von besonderer Bedeutung allein betrachtet	<b>D</b> : in der Anmeldung angeführtes Dokument																
<b>Y</b> : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie	<b>L</b> : aus andern Gründen angeführtes Dokument																
<b>A</b> : technologischer Hintergrund																	
<b>O</b> : nichtschriftliche Offenbarung																	
<b>P</b> : Zwischenliteratur																	
<b>T</b> : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze	<b>&amp;</b> : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument																





Europäisches  
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

0088046  
Nummer der Anmeldung

-2- EP 83 81 0060

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	betri ft Ansp'uch	
A	<p>Zeile 3; Beispiel 2,3 *</p> <p>--</p> <p><u>FR - A - 2 344 290 (ICI)</u></p> <p>* Seite 2, Zeile 22 - Seite 3, Zeile 39; Beispiel 1, Zeilen 19-38; Beispiel 2, Zeilen 22-37; Seite 7, Zeile 15 - Seite 8, Zeile 2; Ansprüche 1-4 *</p> <p>--</p>	1-26	
P,X	<p><u>EP - A - 0 055 576 (THE PROCTER AND GAMBLE COMPANY)</u></p> <p>* Seite 4, Zeile 7 - Seite 5, Zeile 27; Seite 7, Zeile 31 - Seite 9, Zeile 9; Seite 10, Zeilen 1-12; Beispiel 1; Anspruch 1 *</p> <p>----</p>	1-26	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.)